枯草芽孢杆菌、蒙脱石及其互作对产蛋鸡生产性能、养分表观利用率和肠黏膜养分转运载体基因表达的影响

陈继发[1]　朱　瑾[1]　康克浪[1]　曲湘勇[1*]　薛宏宇[2]　周学彬[3]

（1. 湖南农业大学动物科学技术学院，湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128；2. 美国优哉公司，芝加哥 IL60611；3.上海牧冠企业发展有限公司，上海 201199）

摘　要：本试验旨在研究枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，BS）、蒙脱石（montmorillonite，MMT）及其互作对产蛋鸡生产性能、养分表观利用率和肠黏膜养分转运载体基因表达的影响。采用 2×2 双因子随机试验设计，主效应分别为 BS（0、0.5 g/kg）、MMT（0、0.5 g/kg）及二者互作。选择 360 只 29 周龄健康的罗曼粉壳蛋鸡，随机分为 4 组（每组 6 个重复，每个重复 15 只），分别饲喂基础饲粮（对照组）、基础饲粮+0.5 g/kg BS（BS 组）、基础饲粮+0.5 g/kg MMT（MMT 组）、基础饲粮+0.5 g/kg MMT+0.5 g/kg BS（MMT+BS 组）。预试期 7 d，正试期 70 d。结果显示：1）与对照组相比，各添加组产蛋鸡产蛋率均显著提高（$P<0.05$）；MMT 组和 MMT+BS 组日产蛋量显著提高（$P<0.05$）；MMT+BS 组料蛋比显著降低（$P<0.05$）。2）饲粮中添加 BS 显著提高了干物质、粗脂肪、能量和粗蛋白质的表观利用率（$P<0.05$）；BS 组和 MMT+BS 组能量表观利用率显著高于对照组（$P<0.05$）。3）与对照组相比，各添加组产蛋鸡空肠黏膜碱性氨基酸转运载体 1 mRNA 表达量均显著提高（$P<0.05$）；BS 和 MMT 互作对产蛋鸡空肠黏膜易化葡萄糖转运载体 2 和碱性氨基酸转运载体 1 mRNA 表达量有显著影响（$P<0.05$）。由此可见，饲粮中单独添加 BS 和 MMT 及二者联用均能够提高产蛋鸡的产蛋率和日产蛋量，降低料蛋比；饲粮中添加 BS 能够提高产蛋鸡对饲粮中干物质、粗脂肪、粗蛋白质和能量的表观利用率；饲粮中单独添加 BS 和 MMT 及二者联用均能够上调产蛋鸡肠黏膜碱性氨基酸转运载体 1 基因的表达。

关键词：枯草芽孢杆菌；蒙脱石；生产性能；养分表观利用率；养分转运载体；产蛋鸡

中图分类号：S831　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

收稿日期：2018-02-06

基金项目：湖南畜禽安全生产协同创新中心专项资金（CICAPS）；湖南农业大学产学研合作项目（13098）

作者简介：陈继发（1992—），男，湖南邵阳人，博士研究生，研究方向为家禽营养与健康养殖。E-mail: jifachen@stu.hunau.edu.cn

*通信作者：曲湘勇，教授，博士生导师，E-mail: quxy99@126.com

动物机体的生长发育和维持生产不但与养分的摄入量有关，而且与其对养分的消化吸收能力紧密相关。众所周知，肠道是动物对饲粮养分消化吸收的重要器官，拥有健康的肠道对动物而言至关重要。因此，改善动物肠道健康、提高饲料利用率是畜牧业健康发展面临的重大课题。枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，BS）是生产中应用广泛的微生物饲料添加剂之一，它可以优化肠道菌群、改善肠道形态、增强机体免疫力、促进养分消化吸收，进而提高动物的生产性能[1-4]。蒙脱石（montmorillonite，MMT）是一种天然的硅铝酸盐矿物，有良好的离子交换性、吸附性和黏附性，能在动物肠道中吸附霉菌毒素、重金属、细菌及其毒素，修复和保护消化道黏膜，已被证实可改善动物肠道健康[5-7]。但目前，关于 MMT 对饲粮养分利用影响的研究结论[8-9]不尽一致，还需进一步探讨。饲粮中养分被动物摄入后需要在消化道进行一系列消化后降解为小分子物质，再由肠道中相应的转运载体转运进入细胞被机体吸收利用。因此，转运载体的正常表达对于养分吸收至关重要，BS 和 MMT 是否通过调节肠黏膜养分转运载体的表达而影响饲粮养分的吸收，值得探讨。另外，最近在断奶仔猪上的研究发现，嗜酸乳杆菌和 MMT 联用对调节肠道菌群、改善肠黏膜屏障功能和提高生长性能的作用优于这二者单独使用[10]，这提示益生菌和 MMT 在维护肠道健康和促进养分消化吸收等方面可能具有协同作用，可使动物表现出更好的生产性能。因此，我们推测 BS 和 MMT 联用可能更有利于提高饲粮养分利用率、改善产蛋鸡的生产性能。目前，虽然关于 BS 和 MMT 单独在产蛋鸡生产中的应用已有较多报道，但关于二者之间协同作用的研究尚未报道。鉴于此，本试验旨在探讨 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡生产性能、养分表观利用率和肠道养分转运载体基因表达的影响，并观察 BS 和 MMT 是否具有协同作用，以期为其在产蛋鸡生产中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

BS 为市售产品，活菌数≥1×10^9 CFU/g。MMT 为市售产品，其主要成分为：钙 MMT>70%，无定形水合二氧化硅>15%，其他矿物元素<15%。

1.2 试验设计与饲养管理

本试验于 2017 年 7 月 21 日至 2017 年 10 月 7 日在湖南生安赛特农牧科技有限公司进行。采用 2×2 双因子随机试验设计，主效应分别为 BS（0、0.5 g/kg）、MMT（0、0.5 g/kg）及二

者互作。选择 360 只 29 周龄健康的罗曼粉壳蛋鸡，随机分为 4 组（每组 6 个重复，每个重复 15 只），分别饲喂基础饲粮（对照组）、基础饲粮+0.5 g/kg BS（BS 组）、基础饲粮+0.5 g/kg MMT（MMT 组）、基础饲粮+0.5 g/kg MMT+0.5 g/kg BS（MMT+BS 组）。预试期 7 d，正试期 70 d。预试期各组产蛋鸡统一饲喂基础饲粮，每天对鸡群进行观察，并及时调整鸡群，使各组产蛋鸡的日采食量[（116.61±0.45） g，P=0.603]、产蛋率[（95.72±0.48）%，P=0.955]和蛋重[（59.90±0.21） g，P=0.689]差异不显著。试验用基础饲粮参考《鸡饲养标准》（NY/T 33-2004）并结合生产实际配制，其组成及营养水平见表 1。在基础饲粮配制好后，准确称取所需的 BS 和 MMT 添加到基础饲粮中，逐级充分混匀，在配制 MMT+BS 组试验饲粮时，先将所需的 BS 和 MMT 充分混匀后再逐级混匀于基础饲粮中。

产蛋鸡采用上、中、下 3 层阶梯式笼养，每笼 3 只，每 5 笼 1 个重复，各组的试验鸡保证分布在上、中、下层的数量相等。每日喂料 2 次，捡蛋 2 次，上午、下午各匀料 2 次。各组产蛋鸡饲养管理条件相同，试验第 1~5 周鸡舍温度、相对湿度分别为（27.06±2.27） ℃、（77.39±6.13）%；试验第 6~10 周鸡舍温度、相对湿度分别为（24.03±2.40） ℃、（77.07±6.21）%。产蛋鸡自由采食、饮水，每日光照时间为 16 h，自然光照和人工光照相结合。每日清扫鸡舍 1 次，每周对鸡舍喷雾消毒 2 次，每隔 3 d 清粪 1 次。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet　（air-dry basis）　%

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels[2)]	含量 Content
玉米 Corn	64	代谢能 ME/(MJ/kg)	11.25
豆粕 Soybean meal	24	粗蛋白质 CP	16.94
石粉 Limestone	8	赖氨酸 Lys	0.94
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1	蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.55
预混料 Premix[1)]	3	钙 Ca	3.51
合计 Total	100	有效磷 AP	0.34

[1)]预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet：VA 7 500 IU，VD_3 3 000 IU，VE 20 IU，VK_3 2 mg，VB_1 1.98 mg，VB_2 4.98 mg，VB_6 4.98 mg，VB_{12} 0.02 mg，烟酸 nicotinic acid 30 mg，泛酸 pantothenate 15 mg，叶酸 folic acid 0.78 mg，生物素 biotin 0.2 mg，Fe (as ferrous sulfate) 75 mg，Cu (as copper sulfate) 10 mg，Se (as sodium selenite) 0.3 mg，Zn (as zinc sulfate) 70 mg，Mn (as manganese sulfate) 60 mg，I (as potassium iodide) 1 mg，Ca 3.3 g，P 1.05 g，NaCl 3.5 g。

2)营养水平均为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.3 检测指标与方法

1.3.1 生产性能

正式试验期内，每日记录各组（以重复为单位）的产蛋数、蛋重、软破壳蛋数和死淘鸡数，每周统计 1 次采食量，计算统计期内的平均日采食量（ADFI）、产蛋率、平均蛋重、料蛋比、日产蛋量和死淘率。

1.3.2 养分表观利用率

代谢试验进行 3 d（试验第 66、67、68 天），采用内源性指示剂法。每个重复随机选取 1 只鸡单独饲养，在鸡笼下面放干净集粪盘。每天喂料和收粪 2~3 次，自由采食、饮水。收粪前仔细拣去粪盘中的羽毛、饲粮和皮屑等杂物，粪样立即用 10%盐酸固定，将 3 d 收集的粪样充分混匀并装于密封袋，做好标记，－20 ℃冰箱保存。

将粪样置于烘箱中，65 ℃烘干至恒重，然后于室温下回潮，粉碎过 40 目筛，制得风干粪样。将饲粮样粉碎过 40 目筛。粪样与饲粮样做好标记，置于干燥器中密封保存。参照张丽英[11]的方法测定饲粮和粪便中干物质、粗蛋白质、能量、粗脂肪、钙和磷的含量。参照 GB/T 23742-2009 测定饲粮和粪便中盐酸不溶灰分含量。养分表观利用率计算公式如下：

某养分表观利用率（%）=100－100×（粪便中某养分含量×饲粮中盐酸不溶灰分含量）/（粪便中盐酸不溶灰分含量×饲粮中某养分含量）。

1.3.3 肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达量

试验结束后，从每个重复中随机选取 1 只鸡，屠宰后迅速剖开腹腔，取空肠并挤出食糜，用灭菌生理盐水轻轻冲洗除去肠壁内容物，用灭菌载玻片小心刮取空肠黏膜 1~2 g，用锡箔纸包好，立即放入液氮速冻，运回实验室后于－80 ℃冰箱冻存。

使用 Trizol 法提取空肠黏膜总 RNA，并用蛋白核酸测定仪（ND-2000 UV，赛默飞世尔，美国）和 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度和质量后，利用反转录试剂盒（宝生物，大连）反转录制备 cDNA，并以其为模板使用荧光定量 PCR 试剂盒（宝生物，大连）参照其说明书进行荧光定量 PCR 扩增。荧光定量 PCR 仪为 CFX96 型（伯乐，美国），反应体系为 10 μL：SYBR 5 μL，上游引物 0.4 μL，下游引物 0.4 μL，cDNA 1 μL，单蒸水（dH_2O）3.2 μL。反应程序：95℃ 30 s；95℃ 5 s、60 ℃ 40 s，39 个循环；在 65~95 ℃绘制熔解曲线。以 β -

肌动蛋白（β-actin）为参比基因，引物采用 Primers 软件设计，由上海生工生物有限公司合成，引物序列见表 2，目的基因 mRNA 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

表 2　引物序列信息

Table 2　Information of primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5′—3′)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
β-肌动蛋白 β-actin	上游:GAGAAATTGTGCGTGACATCA 下游:CCTGAACCTCTCATTGCCA	NM.205518.1
小肽转运载体 1 *PepT*1	上游:TACGCATACTGTCACCATCA 下游:TCCTGAGAACGGACTGTAAT	NM.204365
碱性氨基酸转运载体 1 *CAT*1	上游:ATTTGGTGCTCGTGTTCCT 下游:TTGTAAATGTCCCGTTCAGTC	NM.001145490
钠依赖性葡萄糖转运载 1 *SGLT*1	上游:GGCTGTGATCTCCTTCTG 下游:AGGGATGCCAACATGACTGA	AJ236903
易化葡萄糖转运载体 2 *GLUT*2	上游:CATCTTCTTCATTGTTCCTGAGAC 下游:CAAATCCATCATCTGTTCCACA	XM.417596
脂肪酸转运载体 4 *FATP*4	上游:ATACCTCTGGCACTACGGGAAT 下游:CATACATCACATCATCGGGTCT	XM.415504

1.4　数据统计与分析

采用 SAS 9.2 统计软件中的一般线性模型（GLM）程序进行双因子分析，并用 Duncan 氏法进行多重比较。结果以平均值和集合标准误（SEM）表示，用 P<0.05 表示差异显著，0.05≤P<0.10 表示有提高或降低的趋势。

2　结　果

2.1　BS、MMT 及其互作对产蛋鸡生产性能的影响

由表 3 可知，与对照组相比，各添加组产蛋鸡产蛋率均显著提高（P<0.05）；MMT 组和 MMT+BS 组日产蛋量较对照组显著提高（P<0.05）；MMT+BS 组料蛋比较对照组和 BS 组显著降低（P<0.05）；各组间 ADFI、死淘率和平均蛋重均差异不显著（P>0.05）。主效应分析表明，饲粮中添加 BS 显著提高了产蛋率和日产蛋量（P<0.05）；饲粮中添加 MMT 显著提高了产蛋率和日产蛋量（P<0.05），显著降低了料蛋比（P<0.05），有提高平均蛋重的趋势（P=0.090）；BS 和 MMT 互作对产蛋鸡生产性能无显著影响（P>0.05）。

表 3　BS、MMT 及其互作对产蛋鸡生产性能的影响

Table 3　Effects of BS, MMT and their interaction on performance of laying hens

枯草芽孢杆菌 BS/(g/kg)	蒙脱石 MMT/(g/kg)	平均日采食量 ADFI /g	产蛋率 Laying rate /%	料蛋比 Feed to egg rate	日产蛋量 Daily egg production/g	平均蛋重 Average egg weight/g	死淘率 Mortality and cull rate/%
0	0	118.97	94.33^{b}	2.088^{a}	57.00^{b}	60.46	3.34
0.5	0	120.07	95.94^{a}	2.073^{a}	58.00^{ab}	60.46	2.22
0	0.5	119.83	96.03^{a}	2.053^{ab}	58.40^{a}	60.80	0.00
0.5	0.5	120.13	96.57^{a}	2.032^{b}	59.15^{a}	61.26	2.22
SEM		0.27	0.56	0.007	0.24	0.17	0.75
P 值 *P*-value		0.412	0.028	0.020	0.006	0.276	0.480
主效应分析 Main effect analysis							
枯草芽孢杆菌	0	119.40	95.18^{b}	2.071	57.70^{b}	60.62	1.67
BS	0.5	120.10	96.26^{a}	2.053	58.58^{a}	60.86	2.22
蒙脱石	0	119.52	95.13^{b}	2.081^{a}	57.50^{b}	60.45	2.78
MMT	0.5	119.98	96.30^{a}	2.043^{b}	58.78^{a}	61.03	1.11
P 值 *P*-value							
枯草芽孢杆菌 BS		0.204	0.048	0.146	0.030	0.467	0.717
蒙脱石 MMT		0.403	0.026	0.005	0.003	0.090	0.283
枯草芽孢杆菌×蒙脱石 BS×MMT		0.463	0.337	0.786	0.747	0.520	0.283

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），相同或无字母表示差异不显著（*P*>0.05）。下表同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05). The same as below.

2.2 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡养分表观利用率的影响

由表 4 可知，BS 组粗脂肪表观利用率较 MMT 组有提高的趋势（*P*=0.083）；与对照组相比，BS 组和 MMT+BS 组能量表观利用率显著提高（*P*<0.05）；BS 组和 MMT+BS 组粗蛋白质表观利用率均高于对照组，但差异不显著（*P*>0.05）。主效应分析表明，饲粮中添加 BS 显著提高了干物质、粗脂肪、能量和粗蛋白质的表观利用率（*P*<0.05）；MMT、MMT 和 BS 互作对产蛋鸡养分表观利用率均无显著影响（*P*>0.05）。

表 4 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡养分表观利用率的影响

Table 4 Effects of BS, MMT and their interaction on apparent utilization of nutrients in laying hens %

枯草芽孢杆菌	蒙脱石	干物质 DM	钙 Ca	磷 P	粗灰分 ash	粗脂肪 EE	能量 Energy	粗蛋白质 CP

BS/(g/kg)	MMT/(g/kg)							
0	0	52.62	37.54	41.79	34.29	56.65	60.36[b]	50.95
0.5	0	57.07	37.12	42.33	28.05	64.67	70.76[a]	56.39
0	0.5	49.55	43.11	37.58	36.79	52.46	59.96[b]	48.05
0.5	0.5	58.08	40.32	40.31	33.29	60.33	70.71[a]	57.20
SEM		1.60	2.30	2.11	2.15	1.78	1.66	1.68
P 值 *P*-value		0.204	0.800	0.883	0.544	0.083	0.008	0.162
主效应分析 Main effect analysis								
枯草芽孢杆菌	0	51.09[b]	40.32	39.45	35.66	54.55[b]	60.16[b]	49.50[b]
BS	0.5	57.57[a]	38.72	41.23	30.67	62.50[a]	70.73[a]	56.80[a]
蒙脱石	0	54.85	37.33	42.09	30.89	60.66	65.56	53.67
MMT	0.5	53.82	41.72	39.07	35.04	56.39	65.33	52.63
P 值 *P*-value								
枯草芽孢杆菌 BS		0.047	0.743	0.699	0.269	0.024	<0.001	0.033
蒙脱石 MMT		0.741	0.372	0.517	0.380	0.203	0.935	0.747
枯草芽孢杆菌×蒙脱石 BS×MMT		0.513	0.808	0.813	0.758	0.982	0.946	0.567

134 2.3 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达量的影响

135 由表 5 可知，MMT+BS 组产蛋鸡空肠黏膜易化葡萄糖转运载体 2（*GLUT*2）mRNA 表
136 达量较 MMT 组有提高的趋势（*P*=0.072）；与对照组相比，各添加组产蛋鸡空肠黏膜碱性氨
137 基酸转运载体 1（*CAT*1）mRNA 表达量均显著提高（*P*<0.05）。主效应分析表明，饲粮中添
138 加 BS 对产蛋鸡肠黏膜各养分转运载体 mRNA 表达量均无显著影响（*P*>0.05）；饲粮中添加
139 MMT 显著上调了产蛋鸡肠黏膜 *CAT*1 mRNA 表达量（*P*<0.05）；BS 和 MMT 互作对产蛋鸡
140 肠黏膜 *GLUT*2 和 *CAT*1 mRNA 表达量有显著影响（*P*<0.05）。

141 表 5 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡空肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达量的影响

142 Table 5 Effects of BS, MMT and their interaction on mRNA expression levels of nutrient
143 transporters in intestinal mucosa of laying hens

枯草芽孢杆菌 BS/(g/kg)	蒙脱石 MMT/(g/kg)	易化葡萄糖转运载体 2 *GLUT*2	钠依赖性葡萄糖转运载体 1 *SGLT*1	碱性氨基酸转运载体 1 *CAT*1	脂肪酸转运载体 4 *FATP*4	小肽转运载体 1 *PepT*1
0	0	1.00	1.00	1.00[b]	1.00	1.00
0.5	0	0.81	0.93	2.27[a]	0.82	1.22
0	0.5	0.68	1.05	2.59[a]	1.01	0.96
0.5	0.5	1.28	0.58	2.27[a]	1.33	1.06
SEM		0.09	0.12	0.22	0.11	0.15
P 值 *P*-value		0.072	0.574	0.033	0.401	0.944
主效应分析 Main effect analysis						
枯草芽孢杆菌	0	0.84	1.02	1.79	1.00	0.99

BS	0.5	1.03	0.77	2.27	1.08	1.14
蒙脱石	0	0.91	0.96	1.63^{b}	0.91	1.11
MMT	0.5	0.95	0.83	2.43^{a}	1.19	1.02
P 值 *P*-value						
枯草芽孢杆菌 BS		0.189	0.313	0.219	0.734	0.628
蒙脱石 MMT		0.644	0.575	0.046	0.219	0.759
枯草芽孢杆菌×蒙脱石 BS×MMT		0.019	0.431	0.046	0.258	0.851

3 讨 论

3.1 BS、MMT 及其互作对产蛋鸡生产性能的影响

本试验发现，饲粮中添加 MMT 能提高产蛋鸡的产蛋率和日产蛋量，降低料蛋比，该结果与前人的报道[12-14]基本一致。本试验中，饲粮中添加 MMT 对饲粮中各养分的表观利用率均无显著影响，提示 MMT 可能不是通过促进养分的消化吸收而改善产蛋鸡的生产性能的。本课题组前期的研究表明，MMT 明显增强了产蛋鸡的抗氧化和免疫功能，降低了血清和肠道中内毒素含量，改善了肠道菌群和肠黏膜形态[14-16]。因此，我们猜测 MMT 改善产蛋鸡生产性能的原因可能与其维护肠道健康和提高机体的健康水平有关。目前，关于 BS 对产蛋鸡生产性能影响的研究结论不尽一致，但总体上表明其能改善产蛋鸡的生产性能。Guo 等[2]和 Zhang 等[17]均报道，BS 不影响产蛋鸡的产蛋率、平均蛋重和 ADFI，但会降低料蛋比；而 Ribeiro 等[3]研究表明，饲粮中添加 BS 后产蛋鸡的产蛋率提高了 2.63%，日产蛋量提高了 3.96%，但料蛋比无显著变化。本试验发现，饲粮中添加 BS 显著提高了产蛋鸡的产蛋率和日产蛋量，对平均蛋重、料蛋比和 ADFI 无显著影响。本试验还发现，饲粮中添加 BS 提高了产蛋鸡对饲粮中干物质、粗脂肪、能量和粗蛋白质的表观利用率，说明 BS 可通过促进饲粮养分的消化吸收而改善产蛋鸡的生产性能。以上试验结果的差异可能是由于产蛋鸡的饲养阶段、环境卫生条件、试验周期以及 BS 的来源、添加水平等因素的不同所致。本试验首次探讨了 BS 和 MMT 在产蛋鸡上的联用效果，结果表明，MMT+BS 组产蛋率、日产蛋量和平均蛋重均高于 BS 组和 MMT 组，且料蛋比显著低于对照组和 BS 组，说明二者联用可获得更佳的生产性能。类似的，Cao 等[10]报道，MMT-嗜酸乳杆菌复合物对仔猪促生长的效果明显优于单独添加 MMT 或嗜酸乳杆菌。MMT 和益生菌的互作机制可能如下：MMT 通过物理吸附作用，部分固定益生菌于其表面，使益生菌覆盖或埋藏于蒙脱石的颗粒中，可能为益生菌对抗消化道中的恶劣环境提供物理屏障[18]；MMT 可在消化道内延展，形成连续的保护

膜，且能够与消化道黏液蛋白静电结合，促进黏液量的增加和黏液质量的改善，修复和保护肠道黏膜[19]，可能利于外源益生菌短暂定植于肠道，发挥生态效应；此外，MMT 可吸附肠道有害菌，优化肠道菌群[6]，或许间接提高了益生菌同有害菌的竞争力，增强益生功效。益生菌和 MMT 联用具有一定优势，值得进一步探讨，其联合作用机制还需深入地研究；另外，以 MMT 为载体固定 BS，制备 MMT-BS 复合物，猜想其作用效果可能优于二者简单的物理混合，值得关注和探讨。

3.2　BS、MMT 及其互作对产蛋鸡养分表观利用率的影响

研究表明，BS 可分泌植酸酶、纤维素酶和淀粉酶等多种酶类，补充动物内源酶的不足[20-21]；BS 能够促进消化酶的分泌，提高肠道中消化酶和二糖酶的活性[4,22]；另外，BS 还能改善动物肠道形态，如提高绒毛高度、降低隐窝深度、增加养分与肠绒毛的接触面积[1,4]。综上，BS 可通过产生多种酶类、促进消化酶分泌和改善肠黏膜形态等促进养分的消化与吸收，提高饲粮养分的利用率。本试验发现，饲粮中添加 BS 能够提高产蛋鸡对饲粮中干物质、粗脂肪、能量和粗蛋白质的表观利用率，该结果与前人在蛋鸡[4]、肉鸡[23]和鹅[24]上的试验结果基本一致。董淑慧[8]研究发现，饲粮中添加 0.5%或 1.0%的 MMT 不影响奶牛饲粮中干物质、蛋白质、纤维和有机物的消化率，而添加 2.5%以上的 MMT 使得养分的消化率显著降低；李静等[9]报道，肉鸡饲粮中添加 0.1%的载铜 MMT 不影响干物质、能量和粗蛋白质的表观利用率，而添加 0.2%以上的载铜 MMT 后养分表观利用率显著降低。上述研究表明，添加较低水平的 MMT 不影响饲粮养分的利用率，本试验的结果也证实了这一结论。MMT 比表面积大，表面分布着无数微孔，具有很强的吸附性能，在肠道中可能会吸附饲粮养分，影响养分利用；同时，其能保护消化道黏膜，增加肠道食糜黏度，改善肠道健康，可能也利于养分消化、吸收。但是，过量添加 MMT 会稀释饲粮养分，且其对养分的吸附作用也会加强，进而降低养分的利用率。此外，本试验还发现，与单独添加 MMT 相比，MMT 和 BS 联用显著提高了能量的表观利用率，干物质、粗脂肪和粗蛋白质的表观利用率也有所提高；然而，MMT 和 BS 联用与单独添加 BS 相比并没有表现出优势，二者联用对促进饲粮养分利用是否具有协同作用还有待进一步探讨。

3.3　BS、MMT 及其互作对产蛋鸡肠黏膜养分转运载体基因表达的影响

糖类、蛋白质和脂类是动物生长和维持生产不可或缺的三大养分，它们被动物摄入后需

要在胃肠道中进行一系列消化后降解为氨基酸、小肽、单糖和脂肪酸等小分子物质，再由肠道刷状缘膜和基底膜中相应转运载体转运进入血液循环供机体代谢使用。因此，转运载体的正常表达对于动物机体至关重要。本试验发现，BS、MMT 及其联用均能上调产蛋鸡肠黏膜 *CAT*1 mRNA 表达量，二者联用还有提高 *GLUT*2 mRNA 表达量的趋势，且二者互作对 *CAT*1 和 *GLUT*2 mRNA 表达量有显著影响，提示 BS 和 MMT 联用可增强肠道对碱性氨基酸和葡萄糖的吸收能力，有利于提高饲粮养分的利用率。本试验中，虽然 MMT+BS 组干物质、能量和粗蛋白质的表观利用率均高于其他组，但 BS 和 MMT 对各养分的表观利用率均未产生显著的交互作用。动物体内养分代谢的过程相对复杂，尽管 BS 和 MMT 联用促进了肠道对饲粮养分的吸收，使更多的养分能够进入血液循环供机体代谢使用，但代谢过程中可能受到其他因素的影响，导致养分的利用率并没有明显提高；此外，本研究仅是从转录水平初步探讨了养分转运载体基因的表达情况，基因在转录水平上的表达与在蛋白质水平上的表达可能存在一定差异，本研究中养分转运载体基因表达的结果还需在蛋白质水平上进行验证。肠上皮细胞中转运载体的表达受小肠肠腔中养分的调节，其含量增加，相应转运载体的数量和活性也随之增加[25-26]。我们猜测 MMT 和 BS 可能是通过促进饲粮养分的消化，使肠腔中小分子养分含量增加而上调相关转运载体基因的表达。目前，关于 MMT 和 BS 对动物肠道养分转运载体基因表达影响的研究非常少，今后还需进一步探讨。

4 结 论

① 饲粮中单独添加 BS 和 MMT 及二者联用均能够提高产蛋鸡的产蛋率和日产蛋量，降低料蛋比。

② 饲粮中添加 BS 能够提高产蛋鸡对饲粮中干物质、粗脂肪、粗蛋白质和能量的表观利用率。

③ 饲粮中单独添加 BS 和 MMT 及二者联用均能够上调产蛋鸡肠黏膜 *CAT*1 的表达。

参考文献：

[1] FORTE C,ACUTI G,MANUALI E,et al.Effects of two different probiotics on microflora,morphology,and morphometry of gut in organic laying hens[J].Poultry Science,2016,95(11):2528–2535.

[2] GUO J R,DONG X F,LIU S,et al.Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance,egg quality,and fecal and cecal microbiota of laying hens[J].Poultry Science,2017,96(5):1280–1289.

[3] RIBEIRO V L,ALBINO L F T,ROSTAGNO H S,et al.Effects of the dietary supplementation of *Bacillus subtilis* levels on performance,egg quality and excreta moisture of layers[J].Animal Feed Science and Technology,2014,195:142–146.

[4] 戴世震.饲粮阶段性添加枯草芽孢杆菌对蛋鸡生产性能及养分代谢率的影响[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2017:16–22.

[5] ZHAO H Y,MAO X B,YU B,et al.Excess of dietary montmorillonite impairs growth performance,liver function,and antioxidant capacity in starter pigs[J].Journal of Animal Sciences,2017,95(7):2943–2951.

[6] 胡秀荣,吕光烈,陈林深,等.天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究[J].药学学报,2002,37(9):718–720.

[7] HU C H,QIAN Z,SONG J,et al.Effects of zinc oxide-montmorillonite hybrid on growth performance,intestinal structure,and function of broiler chicken[J].Poultry Science,2013,92(1):143–150.

[8] 董淑慧.蒙脱石对泌乳奶牛生产性能、血液代谢及营养物质表观消化率的影响[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2012:22–23.

[9] 李静,孙相俞,万建美.载铜蒙脱石对肉鸡生长性能和养分表观利用率的影响[J].中国饲料,2016(22):21–24.

[10] CAO S T,WANG L,JIAO L F,et al.Effects of diosmectite-*Lactobacillus acidophilus* on growth performance,intestine microbiota,mucosal architecture of weaned pigs[J].Animal Feed Science and Technology,2016,220:180–186.

[11] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2007:52–78.

[12] 李俊营,詹凯,陈旭伍,等.日粮添加霉菌毒素吸附剂对蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J].西北农业学报,2012,21(10):7–11.

[13] 陈继发,罗玲,曲湘勇,等.霉菌毒素吸附剂对产蛋鸡生产性能、蛋黄中微量元素含量、血

清抗氧化和生化指标的影响[J].动物营养学报,2016,28(10):3183–3191.

[14] 陈继发,彭灿阳,曲湘勇,等.蒙脱石对产蛋鸡生产性能和盲肠菌群的影响[J].动物营养学报,2017,29(11):4026–4035.

[15] QU X Y,CHEN J F,HE C Q,et al.Effects of modified montmorillonite adsorbent on performance,egg quality,serum biochemistry,oxidation status,and immune response of laying hens in late production[J].Livestock Science,2018,210:15–20.

[16] 陈继发.钙质蒙脱石对蛋鸡产蛋末期生产性能、脂多糖含量、肠道形态及经济效益的影响[C]//中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十二次动物营养学术研讨会论文集.武汉:中国畜牧兽医学会动物营养学分会,2016:363.

[17] ZHANG J L,XIE Q M,JI J,et al.Different combinations of probiotics improve the production performance,egg quality,and immune response of layer hens[J].Poultry Science,2012,91(11):2755–2760.

[18] LI S L,JIANG C X,CHEN X M,et al.*Lactobacillus casei* immobilized onto montmorillonite:survivability in simulated gastrointestinal conditions,refrigeration and yogurt[J].Food Research International,2014,64:822–830.

[19] ALBENGRES E,URIEN S,TILLEMENT J P,et al.Interactions between smectite,a mucus stabilizer,and acidic and basic drugs:*in vitro* and *in vivo* studies[J].European Journal of Clinical Pharmacology,1985,28(5):601–605.

[20] KEROVUO J,LAURAEUS M,NURMINEN P,et al.Isolation,characterization,molecular gene cloning,and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J].Applied and Environmental Microbiology,1998,64(6):2079–2085.

[21] ZCAN B D, ZCAN N.Expression of thermostable α-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in various *Bacillus subtilis* strains[J].Annals of Microbiology,2008,58(2):265–268.

[22] 谢鹏,付胜勇,戴鑫,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂对乳鸽消化道酶活性和血清生化指标的影响[J].饲料工业,2014,35(24):7–11.

[23] GAO Z H,WU H H,SHI L,et al.Study of *Bacillus subtilis* on growth performance,nutrition

metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens[J].Animal Nutrition,2017,3(2):109–113.

[24] 张泽楠,王宝维,葛文华,等.枯草芽孢杆菌与铜协同作用对 5~16 周龄五龙鹅生长性能、屠宰性能、营养物质利用率及肉品质的影响[J].动物营养学报,2016,28(9):2830–2838.

[25] 熊霞,阳成波,印遇龙.肠道氨基酸及氨基酸转运载体研究进展[J].生理科学进展,2012,43(3):202–206.

[26] 周玲,王晓清,刘臻,等.营养素转运载体的研究进展[J].饲料研究,2013(4):18–23.

Effects of *Bacillus Subtilis*, Montmorillonite and Their Interaction on Performance, Apparent Utilization of Nutrients, and Expression of Nutrient Transporters in Intestinal Mucosa of Laying Hens

CHEN Jifa[1] ZHU Jin[1] KANG Kelang[1] QU Xiangyong[1*] XUE Hongyu[2] ZHOU Xuebin[3]

(1. *Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety*, *College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *Oil-Dri Corporation of America*, *Chicago*, *IL* 60611, *USA*; 3. *Shanghai Naseco Products Company*, *Shanghai* 201199, *China*)

Abstract: This study was conducted to evaluate the effects of *Bacillus subtilis* (BS), montmorillonite (MMT) and their interaction on performance, the apparent utilization of nutrients, and the expression of nutrient transporters in intestinal mucosa of laying hens. The trial used a 2×2 factorial random design, the main effects were BS (0 and 0.5 g/kg), MMT (0 and 0.5 g/kg), and the interaction between them, respectively. A total of 360 healthy 29-week-old Lohmann pink hens were randomly arranged into 4 groups with 6 replicates per group and 15 hens in each replicate, and the hens in those 4 groups were fed a basal diet (control group), the basal diet+0.5 g/kg BS (group BS), the basal diet+0.5 g/kg MMT (group MMT), and the basal diet+0.5 g/kg MMT+0.5 g/kg BS (group MMT+BS), respectively. The adjustment period lasted for 7 days, and the

---

*Corresponding author, professor, E-mail: quxy99@126.com (责任编辑 菅景颖)

experimental period lasted for 70 days. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the laying rate of hens in addition groups was significantly increased ($P<0.05$), and daily egg production of hens in groups MMT and MMT+BS was significantly increased ($P<0.05$), and feed to egg rate of the group MMT+BS was significantly decreased ($P<0.05$). 2) Dietary BS significantly increased the apparent utilization of dry mater, ether extract, crude protein and energy ($P<0.05$). The apparent utilization of energy in groups BS and MMT+BS was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). 3) Compared with the control group, the mRNA expression level of cationic amino acid transporter 1 (*CAT*1) in jejunal mucosa of laying hens in addition groups was significantly up-regulated ($P<0.05$). There was a significant interaction between BS and MMT on the mRNA expression levels of facilitative glucose transporter 2 (*GLUT*2) and *CAT*1 ($P<0.05$). In conclusion, single or combined addition of BS and MMT all can improve the laying rate and daily egg production of laying hens, and reduce the feed to egg rate; addition of BS can improve the apparent utilization of dry mater, ether extract, crude protein and energy of laying hens; single or combined addition of BS and MMT all can up-regulate the expression of *CAT*1 in intestinal mucosa of laying hens.

Key words: *Bacillus subtilis*; montmorillonite; performance; apparent utilization of nutrients; nutrient transporters; laying hens